Ontogenèse des fonctions digestives et besoins nutritionnels chez les larves de poissons marins

par

Chantal CAHU & José ZAMBONINO INFANTE (1)

RÉSUMÉ. - La production de larves de poisson en écloserie augmente régulièrement pour de nombreuses espèces, mais les besoins nutritionnels des larves restaient encore mal connus il y a quelques années. Nous avons réalisé des séries d'expériences dans le but de comprendre les spécificités digestives de la larve, et de formuler un aliment en tenant compte de ces différences par rapport au juvénile. Le modèle utilisé était le bar, *Dicentrachus labrax*, et les données obtenues ont été validées sur d'autres espèces. Les larves étaient nourries avec des proies vivantes ou avec des aliments composés expérimentaux spécialement formulés pour l'expérience. Il est apparu d'abord que les enzymes digestives pancréatiques telles que l'amylase et la trypsine apparaissent très rapidement lors de l'ontogenèse et augmentent considérablement pendant les premiers jours de développement. La digestion intestinale passe par un processus de maturation : les enzymes cytosoliques, majoritairement des peptidases, diminuent au cours des premiers jours alors que les enzymes de la bordure en brosse de l'intestin, telle que la phosphatase alcaline, augmentent considérablement. Le profil d'activité des enzymes digestives au cours du développement est génétiquement déterminé, mais l'expression des enzymes peut être modifiée par l'alimentation. Parmi les différentes enzymes, la phospholipase A2 des larves de bar est finement régulée par la quantité de phospholipides dans l'aliment. Cette régulation se produit au niveau transcriptionnel, comme le montre le dosage de l'activité de l'enzyme et la quantification des ARMm codant pour cette enzyme. Par ailleurs, le développement des larves, évalué en termes de croissance, survie et qualité du squelette, est directement lié à la quantité de phospholipides dans l'aliment. Il apparaît donc que cette forte régulation de la phospholipase est associée à un besoin spécifique des larves de poissons en phospholipides alimentaires. L'étude de l'effet de différents nutriments sur l'expression des enzymes digestives permet donc la mise au point d'un aliment spécialement adapté aux besoins spécifiques des larves.

ABSTRACT. - Ontogenesis of digestive functions and nutritional requirements in marine fish larvae.

The production of fish larvae by hatchery shows an intensive increase for several species, but the specific nutritional requirements of larvae were poorly known until some years. We have conducted several experiments aimed to understand the specificities in larvae digestion, and to formulate a compound diet taking into account the differences compared to juveniles. The chosen species was the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and the data were validated on different species. Larvae were fed live preys or experimental compound diet, especially formulated for the experiment. It appeared that pancreatic digestive enzymes, such as trypsin and amylase could be assayed in early ontogenesis, before mouth opening, and increase dramatically during the first days of life. The intestinal digestion goes through a maturation process: the cytosolic enzymes, mainly peptidases, decrease during the first days, when concurrently the brush border membrane enzymes, such as alkaline phosphatase, increase. The activity pattern during development is genetically determinated, but the enzyme expression can be modulated by diet composition. The first experiments were aimed to determine the level of protein nutritional requirement during larval development. The best growth and survival were obtained with diet incorporating 50 and 60% protein / diet dry matter. Nevertheless, a poor regulation of the enzyme hydrolyzing protein, trypsin, was evidenced in young stages. Following experiments showed that dietary peptides induce better digestive enzyme regulation than native proteins: incorporation of peptides in diet fed to larvae induced a proportional enhancement of peptidases. This higher activity was associated to better growth and survival, suggesting a specific requirement in larval stages for peptides. Phospholipids appeared to be another specific larval requirement in larvae. Indeed, in sea bass larvae phospholipase A2 was largely regulated by phospholipid concentration in the diet. This regulation occurs at transcriptional level, as shown by enzyme activity and quantity of ARNm coding for phospholipase. Besides, larval development, assayed by growth, survival and skeletal quality, was directly related to dietary phospholipid amount. This suggests that the high regulation of phospholipase is associated to a specific dietary phospholipid requirement in larvae. The study of the effect of the different nutrients on digestive enzyme expression allowed the formulation of a diet especially adapted to larval requirements.

Key words. - *Dicentrarchus labrax* - Larvae - Nutrition - Digestive enzymes - Phospholipid - Peptides.

Le développement durable de la pisciculture ne pourra se faire que si le prélèvement d'alevins dans la nature n'augmente pas et si le relais de la fourniture d'alevins est pris par les écloseries. La production d'alevins est encore largement dépendante d'élevages annexes de "proies vivantes" : les larves sont nourries pendant les premiers jours de leur vie avec un rotifère, *Brachionus* sp., mesurant environ 100 µm, puis avec les jeunes stades de développement (nauplius et metanauplius) d'un petit crustacé, *Artemia salina*, mesurant environ 500 µm. Des algues unicellulaires doivent être cultivées dans les écloseries pour nourrir les *Brachionus*. Ces élevages annexes constituent donc une part très importante

(1) UMR Nuage (Ifremer-INRA-Université Bordeaux 1), Ifremer, BP 70, 29280 Plouzané, FRANCE. [Chantal.Cahu@ifremer.fr]

du coût de production de l'alevin. D'autre part, la qualité de ces proies n'est pas constante et introduit une variabilité supplémentaire dans les élevages des stades précoces de poisson.

Différentes équipes de recherche travaillent depuis quelques années sur la mise au point d'un aliment composé adapté aux besoins spécifiques des larves de poisson, afin de fiabiliser la production d'alevins en écloserie et d'en abaisser le coût. Jusqu'à récemment, tous les essais d'alimentation des très jeunes larves de poisson marin avec un aliment composé se soldaient par un échec, bien que les larves ingéraient l'aliment. Malgré des résultats encourageants sur la daurade *Sparus aurata* (Fernandez-Diaz et Yufera, 1997), la daurade japonaise *Pagrus major* (Takeuchi *et al.*, 1998), le bar *Dicentrarchus labrax* (Cahu *et al.*, 1998), le sevrage, c'est-à-dire la substitution des proies vivantes par un aliment composé, ne pouvait être réalisé que tardivement. L'hypothèse d'une carence en enzymes digestives chez les larves était alors avancée pour expliquer ce phénomène (Kolkovski *et al.*, 1993). En effet, les larves poursuivent leur développement pendant plusieurs semaines après l'éclosion, et en particulier celui de leur tractus digestif, très inachevé à l'éclosion. Les données obtenues sur les besoins nutritionnels des juvéniles sont donc de peu d'utilité pour connaître les besoins des larves (Dabrowski, 1984). Nous avons donc réalisé des séries d'expériences dans le but de comprendre les spécificités digestives de la larve et de formuler un aliment en tenant compte de ces différences par rapport au juvénile.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le bar, *Dicentrarchus labrax*, a été choisi comme espèce modèle. C'est une espèce dont l'aquaculture, déjà développée en Méditerranée, bénéficierait de connaissances plus approfondies sur le développement larvaire. Les élevages étaient conduits dans une batterie de bacs de 35 litres, cylindriques, avec un fond légèrement conique, alimentés en eau de mer courante, à 19°C, avec un taux de renouvellement de 50% par heure. Les larves y étaient placées le lendemain de l'éclosion, à raison de 80 par litre. L'ouverture de la bouche avait lieu au jour 5 (5 jours après l'éclosion). Suivant l'expérience, les larves étaient alors alimentées avec la séquence proies vivantes : *Brachionus* sp. jusqu'au jour 9, nauplii d'*Artemia* jusqu'au jour 15 puis *Artemia* de 1 jour jusqu'au sevrage avec l'aliment composé expérimental, ou alimen-

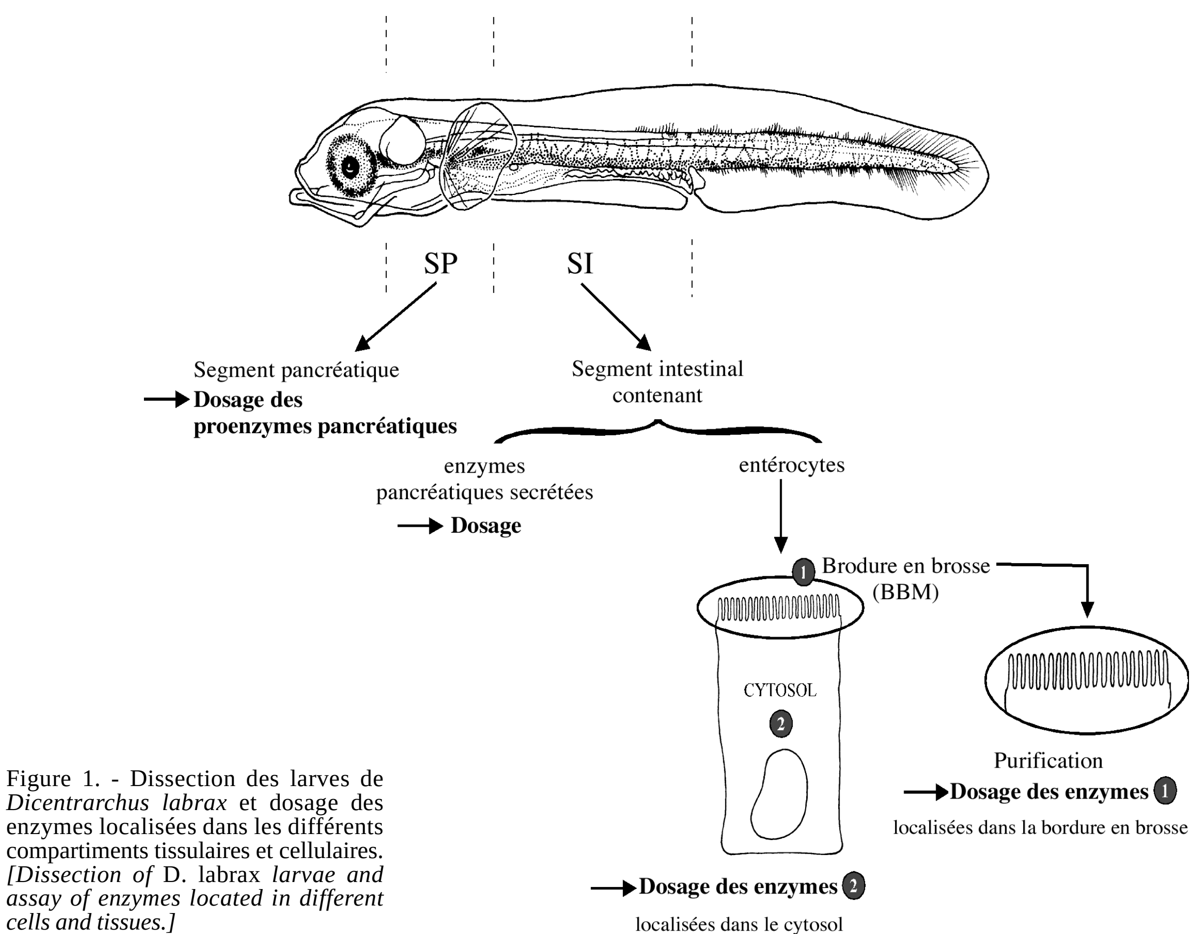


Figure 1. - Dissection des larves de *Dicentrarchus labrax* et dosage des enzymes localisées dans les différents compartiments tissulaires et cellulaires. *[Dissection of* D. labrax *larvae and assay of enzymes located in different cells and tissues.]*

tées dès la première prise de nourriture avec un aliment composé, de taille 120-200 µm jusqu'au jour 20 puis de taille 200-400 µm. Les différents aliments composés étaient fabriqués dans notre laboratoire et distribués en excès par tapis roulant pendant 18 heures/24. Cinq réplicats étaient utilisés par traitement. L'expérience s'achevait au jour 40. Trente larves par bac étaient prélevées 2 fois par semaine et disséquées pour les dosages enzymatiques (Fig. 1), réalisés suivant des protocoles précédemment décrits (Cahu et Zambonino Infante, 1994). Des larves étaient également prélevées et pesées afin de contrôler la croissance. À la fin de l'expérience, les larves de chaque bac étaient comptées 1 par 1 afin d'évaluer la survie.

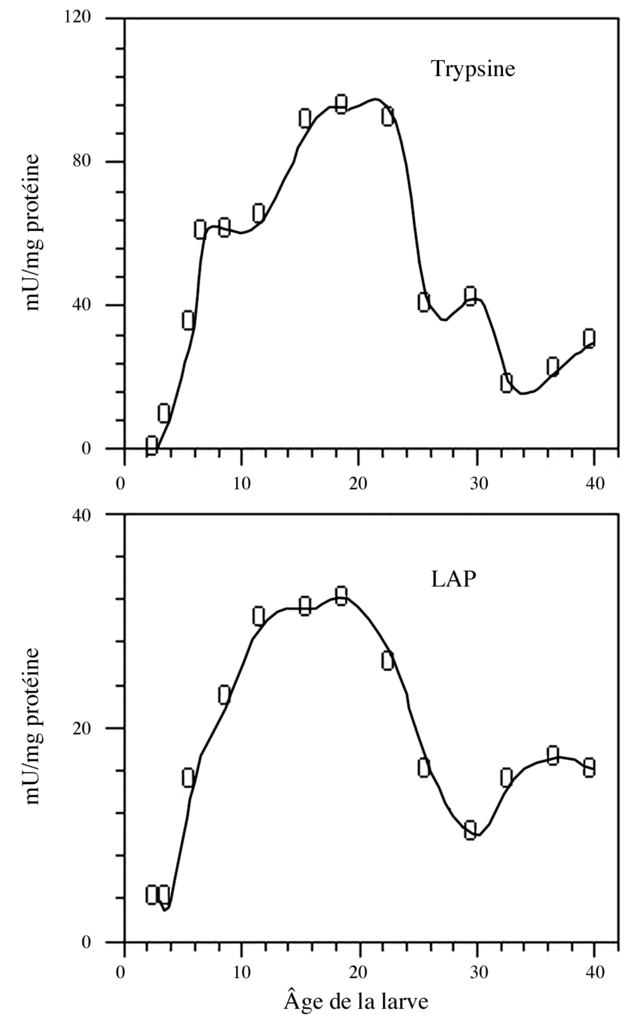


Figure 2. - Evolution d'une enzyme pancréatique, la trypsine, et d'une enzyme intestinale, la leucine aminopeptidase (lap), au cours du développement de la larve de bar (dosées sur des larves entières broyées et homogénéisées). *[Variation of a pancreatic enzyme, trypsin, and an intestinal enzyme, leucine aminopeptidase (lap), during sea bass larval development (assayed on total larvae homogenate).]*

Description de la mise en place des fonctions digestives et effet de l'aliment

Variation de l'activité de différentes enzymes digestives au cours du développement des larves

Les enzymes digestives, pancréatiques et intestinales, les plus couramment dosées ont pu être détectées chez les larves de bar, et ceci dès les plus jeunes stades. En particulier, l'activité de deux enzymes pancréatiques, la trypsine et l'amylase, a pu être détectée chez des larves âgées de 3 jours, chez lesquelles la bouche n'était pas encore ouverte. La trypsine apparaît dès le premier jour chez l'ombrine, *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2000) et chez la sole sénégalaise, *Solea senegalensis*, âgée de 2 jours (Ribeiro *et al.*, 1999). La synthèse de ces enzymes digestives n'est donc pas à ce stade déclenchée par une prise d'aliment. Les activités spécifiques, exprimées en Unité internationale/mg de protéines, de toutes les enzymes digestives dosées dans la larve entière suivent le même profil au cours du développement de la larve : elles augmentent brutalement à la première prise de nourriture, restent à un niveau élevé jusqu'au jour 25 environ puis décroissent (Fig. 2). Elles se stabilisent à un niveau plus bas à partir du jour 30 (Zambonino Infante et Cahu, 1994a). Cette baisse ne correspond pas à une diminution de la quantité d'enzymes mais à une augmentation de l'ensemble des protéines de l'animal. Les larves présentent donc, par rapport à leur poids, une capacité enzymatique considérable.

Le même profil d'activité des enzymes digestives est décrit chez des espèces de divers embranchements, comme les crustacés ou les mammifères : ce profil est caractéristique de la mise en place des enzymes digestives au cours de la période postnatale (Henning, 1987). La pepsine, enzyme gastrique, n'a pu être dosée qu'à partir du jour 25, l'estomac ne devenant fonctionnel qu'à partir de ce moment (Zambonino Infante et Cahu, 1994b).

Adaptation des activités enzymatiques à la quantité et à la composition de l'aliment

Une expérience réalisée en nourrissant des lots de larves de bar avec la ration d'*Artemia ad libitum*, ou 1/2, 1/4, 1/8 de cette ration, a montré que l'activité spécifique de la trypsine était directement liée à la quantité d'aliment ingérée, la composition de l'aliment étant la même pour les quatre lots (Zambonino Infante *et al.*, 1996).

Une autre expérience réalisée en nourrissant les larves avec des aliments composés, formulés afin de représenter un gradient de concentration en protéines et un gradient inverse de concentration en glucides (amidon prégélatinisé) a montré que l'activité spécifique de la trypsine et de l'amylase chez les larves est directement liée à la concentration de leur substrat dans l'aliment ingéré. À titre d'exemple, l'activité de la trypsine augmente de 90% quand la concentration en protéine passe de 30 à 60% dans l'aliment, et celle de l'amy-

lase triple quand la concentration en amidon de l'aliment passe de 7 à 37% (Péres *et al.*, 1996). De même, des larves nourries avec des régimes composés isoprotéiques, mais contenant différents taux de farine de poisson ont montré une adaptation de l'activité de la phosphatase alcaline, enzyme intestinale, à la concentration en substrat phosphorilé des régimes. Il apparaît donc que les larves de bar sont, dès les plus jeunes stades, capables de moduler leurs synthèses enzymatiques en fonction de la quantité et de la nature de l'aliment ingéré. Cependant, la composition du régime alimentaire n'intervient que pour moduler le niveau des activités enzymatiques, le profil d'évolution de ces activités au cours du développement étant déterminé génétiquement.

Les larves ayant une forte capacité enzymatique et étant en mesure de l'adapter à l'aliment proposé, l'hypothèse d'une déficience enzymatique ne peut être retenue pour expliquer les mauvaises croissances des larves nourries avec de l'aliment composé (Cahu et Zambonino Infante, 1997).

Maturation des processus digestifs au cours du développement

Les travaux de différents auteurs ont décrit l'ontogenèse du tractus digestif des larves de poisson marins au cours du développement, en utilisant des techniques d'histologie (Beccaria *et al.*, 1991, Mai *et al.*, 2005). Nos travaux, réalisés en dosant différentes enzymes digestives sur des larves disséquées puis sur des fractions cellulaires purifiées, ont permis de montrer qu'une maturation du tractus digestif s'opère suivant une séquence bien déterminée au cours du développement.

Les enzymes pancréatiques peuvent être détectées avant même l'ouverture de la bouche dans le segment pancréatique mais n'apparaissent que quelques jours après dans la lumière du tube digestif. Ceci suggère que, chez les larves de poisson comme chez les autres organismes, les mécanismes liés à la synthèse des enzymes sont fonctionnels avant les mécanismes liés à la sécrétion. Les enzymes de la bordure en brosse, comme la phosphatase alcaline, la leucine aminopeptidase, la γ-glutamyl transaminase ou la maltase, dosées sur la fraction membranaire purifiée, sont très faiblement exprimées pendant les 3 premières semaines suivant l'éclosion, puis augmentent brutalement du jour 25 au jour 30. Cette brusque montée correspond à un développement morphologique de la bordure en brosse (Fig. 3). Parallèlement, la leucine-alanine peptidase, enzyme localisée majoritairement dans le cytosol, est fortement exprimée chez les jeunes stades, puis décroît fortement autour du jour 25 (Cahu et Zambonino Infante, 1995a).

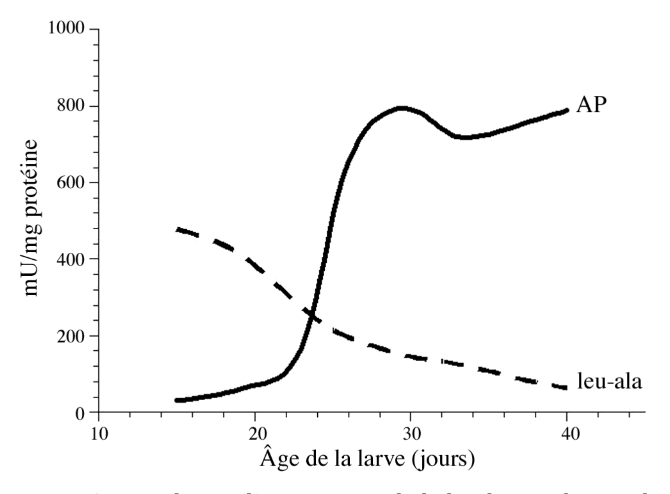


Figure 3. - Evolution d'une enzyme de la bordure en brosse, la phosphatase alcaline (AP, dosée dans la fraction purifiée des bordures en brosse des entérocytes), et d'une enzyme cytosolique, la leucine- alanine peptidase (leu-ala), au cours du développement des larves de bar. *[Variation of a brush border enzyme, alkaline phos - phatase (AP, assayed on purified enterocyte brush border), and of a cytosolic enzyme (leucine-alanine peptidase), during sea bass larval development.]*

Cette mise en place d'un nouveau type de digestion coïncide avec le moment où les larves sont capables de s'alimenter avec un aliment composé conventionnel. La forte augmentation des enzymes de la bordure en brosse, associée à une chute de l'activité des enzymes cytosoliques correspond à une maturation de l'entérocyte et caractériserait le passage d'une digestion de type larvaire à une digestion de type adulte. Le même phénomène de maturation intestinale a été décrit chez plusieurs espèces de poissons. Il se produit à des âges différents suivant les espèces, autour du seizième jour chez des larves de sole sénégalaise (Ribeiro *et al.*, 1999) ou du scianidé *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.*, 2005).

Ces travaux montrent également que les larves ont une grande capacité de digestion cytosolique. Les enzymes cytosoliques étant principalement des di- et tripeptidases, il était nécessaire de tirer parti de cette donnée pour formuler un aliment pour larves.

Effet de l'ingestion d'un aliment composé sur la maturation des fonctions digestives

Les aliments composés utilisés dans nos expériences contenaient, comme tous les aliments destinés aux poissons et crustacés, une base de farine de poisson, d'huile de foie de morue, de lécithine de soja, un mélange minéral et un mélange vitaminique. Différents composants, tels que la levure lactique, de l'hydrolysat de farine de poison, des farines de crevette, de calmar ou des farines végétales étaient ajoutées dans différentes proportions.

Il est apparu que des larves nourries dès les jeunes stades avec un aliment composé, de formulation équilibrée permettant une bonne croissance chez les juvéniles, montraient un retard dans la mise en place des fonctions de sécrétion des enzymes pancréatiques. Ce retard était d'autant plus important que les larves étaient sevrées précocement. Au niveau intestinal, un retard dans l'augmentation de l'activité des enzymes de la bordure en brosse, et dans la décroissance de

Tableau I. - Composition des régimes contenant un gradient de protéine et un gradient inverse de glucides *[Composition of diets including a protein gradient and a reverse glucide gradient.]*

	P30	P40	P50	P60
Farine de poisson	26	35	43	52
Hydrolysat de caséine	10	13,3	17	20
Maltose	12,3	8,9	5,6	2,3
Amidon prégélatinisé	24,5	17,9	11,2	4,5
Huile de foie de morue	8,5	7,6	6,7	5,8
Lécithine de soja	2,9	2,5	2,3	1,9
Cellulose	10,5	9,5	9,2	8,2
Mélange vitaminique	3,0	3,0	3,0	3,0
Mélange minéral	2,0	2,0	2,0	2,0
Vitamine C	0,3	0,3	0,3	0,3
Protéines (N X 6,25)	29,5	40,1	49,7	59,9
Lipides	14,6	15,0	14,9	15,0
Cendre	4,3	6,0	7,4	9,0
Energie (J/100 g matière sèche)	1680	1690	1685	1690

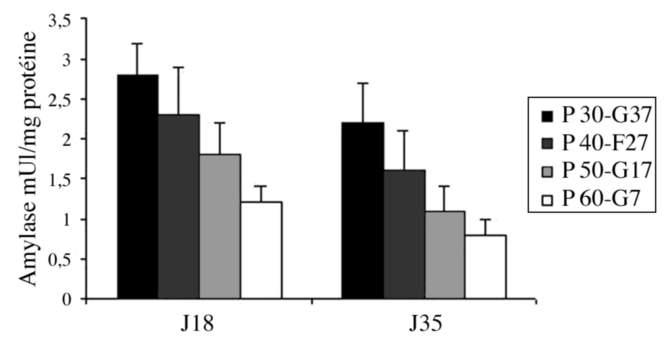


Figure 4. - Activité spécifique de l'amylase chez des larves de bar âgées de 18 et 35 jours et nourries avec un gradient de glucides. *[Amylase specific activity in 18 and 35 days old sea bass larvae fed with a glucide gradient.]*

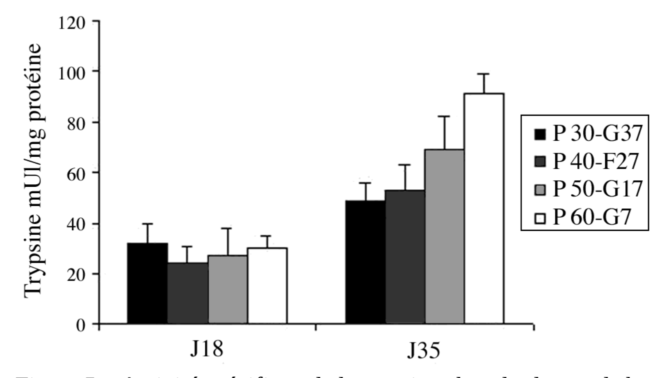


Figure 5. - Activité spécifique de la trypsine chez des larves de bar âgées de 18 et 35 jours et nourries avec un gradient de protéines. *[Trypsin specific activity in 18 and 35 days old sea bass larvae fed with a protein gradient.]*

l'enzyme cytosolique était observé. Il apparaît donc que le sevrage précoce des larves avec un aliment conventionnel retarde, voire empêche, la maturation des fonctions digestives pancréatiques et intestinales (Cahu et Zambonino Infante, 1995a).

Une des conclusions tirées des expériences précédentes était que l'aliment qui conviendrait aux larves serait un aliment qui ne perturberait pas la séquence normale d'apparition des fonctions digestives génétiquement programmée. En tenant compte des données acquises sur les spécificités de la digestion chez les larves, différentes expériences ont été conduites afin de parvenir à la formulation d'un tel aliment.

Besoins en protéines, lipides et phospholipides chez les larves de bar

Les réponses des enzymes digestives nous ont donc aidés à déterminer les besoins des larves pour les grandes classes de nutriments comme les protéines et les lipides (les glucides ne constituant pas un besoin nutritionnel chez les poissons) ainsi les formes moléculaires optimales pour l'apport de ces nutriments.

Fraction protéique de l'aliment

Protéines totales et glucides. - Dans un premier temps, le besoin en protéines totales a été évalué en testant la réponse à 4 régimes alimentaires, isolipidiques et isoénergétiques : l'énergie apportée par les protéines était balancée par l'énergie apportée par des glucides. Les protéines étaient amenées sous forme de farine de poisson, ainsi que de l'hydrolysat de caséine, les glucides étant amenés sous forme de maltose et d'amidon (Tab. I).

Les meilleures croissances et survies ont été obtenues chez les larves nourries avec le régime contenant 50% de protéines et 17% de glucides, suivi de près par les larves nourries avec le régime contenant 60% de protéines et 7% de lipides. La croissance et la survie étant des critères biologiques intégrateurs de l'ensemble des processus métaboliques, on peut donc considérer que les besoins optimaux en protéines sont compris entre 50 et 60% de la matière sèche du régime. Salhi *et al.* (1994) incorporaient 73% de protéine dans des aliments pour daurade, Brinkmeyer et Holt (1995) utilisaient un aliment contenant 50% de protéines chez l'ombrine (*Sciaenops ocellatus*). Ceci constitue des taux élevés par rapport aux besoins des vertébrés supérieurs, mais cohérents avec les besoins en protéines connus chez les juvéniles de poisson.

L'activité spécifique de l'amylase augmentait en fonction du taux de glucides dans les régimes dès le 18e jour après l'éclosion et cette régulation est toujours apparente au jour 35 (Fig. 4). En revanche, quel que soit le régime, la diminution de l'expression de l'amylase apparaît au cours du développement, des forts taux de glucides alimentaires ne parvenant pas à enrayer cette diminution. Cette décroissance de l'amylase au cours du développement serait génétiquement

programmée. La quantification des ARN messagers codant pour l'amylase montre une régulation transcriptionnelle de l'expression de cette enzyme par le taux de glucides.

Au contraire de l'amylase, une corrélation entre l'activité de la trypsine et le taux protéique du régime n'apparaît qu'au jour 35 (Fig. 5). Cette régulation tardive de la trypsine par son substrat suggère que les mécanismes qui contrôlent l'adaptation de la trypsine ne sont pas opérationnels avant le jour 35. Avant cette date, les niveaux d'ARNm codant pour la trypsine étaient comparables quel que soit le taux protéique du régime alimentaire des larves.

Il apparaît ainsi que la régulation de la synthèse des enzymes protéiques est un phénomène âge-dépendant (Péres *et al.*, 1996). Des expériences ultérieures ont montré que ces niveaux d'ARNm codant pour la trypsine varient en fonction de la nature de la protéine utilisée (Péres *et al.*, 1998).

Longueur des chaînes protéiques. - La régulation de la trypsine étant faible chez les jeunes stades, et les larves montrant une forte expression des dipeptidases cytosoliques, nous avons fait l'hypothèse qu'un apport protéique sous forme de protéines hydrolysées pouvait être mieux utilisé par ces jeunes stades que des protéines natives.

Une expérience a été réalisée en utilisant un mélange de di- et tripeptides fabriqué à partir de farine de poisson. Trois aliments étaient ainsi formulés : l'un ne contenant comme source de protéine que de la farine de poisson, dans les deux autres 20 ou 40% de cette farine de poisson était remplacé par le mélange de di-et tripeptides. Ces aliments, outre qu'ils étaient isoprotéiques, isolipidiques et isoénergétiques, présentaient le même profil en acides aminés. Seule la longueur des chaînes protéiques d'une partie de l'aliment changeait. Les larves de bar étaient nourries avec l'un de ces aliments du jour 20 au jour 40.

Ce sont les larves nourries avec le régime contenant 20% de peptides qui ont montré les meilleures croissances et survies. Cette augmentation de la croissance et de la survie était associée à une amélioration générale du développement des larves. Moins de 6% des larves nourries avec ce régime présentaient des malformations squelettiques (colonne vertébrale ou mâchoire), alors que 24% des larves nourries avec le régime ne contenant que des protéines natives présentaient des anomalies. Cette amélioration globale du développement était associée à des activités élevées des peptidases cytosoliques chez les jeunes stades. De plus, chez ces larves, la maturation intestinale, illustrée par l'augmentation brusque des enzymes des bordures en brosse et la décroissance de l'enzyme cytosolique dosée, s'effectuait plus précocement et avec une plus grande amplitude que chez les animaux nourris du régime sans peptides. Cependant, le régime contenant 40% de di- et tripeptides, bien qu'induisant une forte activité cytosolique, ne conduisait pas à de meilleures performances que le régime en contenant 20%. Cet excès de di et tri-peptides dans le régime 40% induisait d'une part un retard du développement de la bordure en brosse, d'autre part conduisait à un apport massif d'acides aminés pouvant saturer les transporteurs (Zambonino Infante *et al.*, 1997). Cet effet positif des hydrolysats a été confirmé par Carvalho *et al.* (1997) chez la carpe.

Cette expérience confirme qu'un bon développement des larves, illustré par une croissance correcte et une survie élevée, est lié au bon déroulement de la séquence de maturation du système digestif et particulièrement à la mise en place, dès J25 chez le bar, d'une digestion efficace au niveau des bordures en brosse. Il a été effectivement démontré chez les mammifères que la “fenêtre d'apparition” des bordures en brosse est très étroite au cours du développement, et que le processus ne peut avoir lieu après ce délai.

Une autre expérience a été réalisée en utilisant une source de peptides du commerce, le CPSP (concentré soluble de protéine de poisson). Il s'agit de peptides d'environ 20 acides aminés, fabriqués à partir de farine de poisson. L'utilisation de ces peptides a permis pour la première fois de réaliser un élevage expérimental en nourrissant des larves de poissons marins avec un aliment composé dès l'ouverture de la bouche, et sans utilisation aucune de proies vivantes. Le taux optimal a été déterminé à 12% de la matière sèche de l'aliment (Cahu *et al.*, 1999). Ces résultats étaient importants, car malgré un rôle avéré des di-et tripeptides sur le développement des larves, le prix de ces composés était rédhibitoire pour un aliment commercial. Au contraire, le CPSP a un prix tout à fait abordable, permettant ainsi son incorporation dans des aliments commerciaux pour larves.

Acides aminés libres. - Si des chaînes de 20 acides aminés, ou même de deux ou trois acides aminés, ont un effet bénéfique sur le développement de larves, l'incorporation dans l'aliment d'acides aminés libres n'a pas montré d'effet sur la croissance ou la survie des larves. Cela va à l'encontre de l'hypothèse de Ronnestad *et al.* (1999) suggérant qu'en absence d'estomac et donc de sécrétion acide et de pepsine, les acides aminés seraient mieux utilisés que des protéines natives. En revanche, une incorporation de 10% d'acides aminés libres a induit une augmentation de la sécrétion de trypsine (Cahu et Zambonino Infante, 1995b). Cette possibilité d'induire plus précocement la sécrétion des enzymes pancréatiques est intéressante, puisque si les mécanismes de synthèse des enzymes sont en place très tôt chez les larves, les mécanismes de sécrétion se mettent en place plus tardivement.

Fraction lipidique de l'aliment. Régulation des enzymes digestives lipolitiques

Besoins en lipides totaux. - Les lipides constituent une source importante d'énergie nutritionnelle, et présents sous forme de deux grandes classes, les lipides neutres et les

Tableau II. - Composition lipidique des régimes ayant un gradient de phospholipides et un gradient inverse de trigycérides. *[Lipid composition of diets including a phospholipid gradient and a reverse triglyceride gradient.]*

		PL3	PL6	PL9	PL12
		g/100 g d'aliment (matière sèche)			
Lipides ajoutés dans l'aliment	Lécithine de soja[1]	0	5,6	11,1	16,7
	Huile de poisson	16,7	11,1	5,6	0
Composition des lipides	Triglycérides	22,9	20,3	17,3	13,7
	Phospholipides	2,7	6,0	9,1	11,6
	Phosphatidylcholine	0,9	1,8	2,6	3,5
	Phosphatidylinositol	0,2	0,7	1,2	1,6
	EPA+DHA[2]	4,9	3,6	2,4	1,5

[1] La lécithine de soja, fournie par Nickerson (Marne-la-Vallée, France), contient 62% de phospholipides, incluant 26% de phosphatidylcholine, 20% de phosphatidylethanolamine et 14% de phosphatidylinositol. *[Soybean lecithin, provided by Nicherson (Marne-la-vallée, France) contains 62% phospholipids, including 20% phosphatidylethanolamine and 14% phosphatidylinositol.]*

[2] EPA : acide eicosapentaenoique ; DHA, acide docosahexaenoique. *[EPA: eicosapentaenoic acid; DHA docosahexaenoic acid.]*

phospholipides. De nombreux auteurs ont abordé l'étude des besoins en lipides totaux, phospholipides et acides gras en nourrissant les larves avec des proies vivantes enrichies en différents lipides (Sargent *et al.*, 1999, Salhi *et al.*, 1999). Ces enrichissements (bain des proies vivantes dans des émulsions) étaient sujets à une grande variabilité et les conclusions étaient difficiles à tirer. Nos expériences conduites en utilisant des aliments de composition prédéterminée nous ont permis d'évaluer la capacité de digestion de ces deux classes de lipides au cours du développement de la larve de bar. Une première expérience a permis de déterminer le taux de lipides totaux optimal pour soutenir le développement des larves de bar. Ce taux a été fixé à 25% de la matière sèche de l'aliment (Zambonino Infante et Cahu, 1999).

Besoins en phospholipides. - Puis, afin de connaître si c'était la fraction phospholipide ou la fraction lipide neutre qui était le mieux utilisée par ces individus en développement, cinq aliments composés isoprotéiniques, isolipidiques et isoénergétiques ont été formulés avec un gradient de 3 à 12% de phospholipides et un gradient inverse de 23 à 14% de lipides neutres (Tab. II).

La quantité relative des grandes classes de lipides s'est révélée déterminante pour le développement des jeunes stades. En effet, il est apparu que la croissance, la survie et qualité du développement squelettique des larves suivaient le gradient de phospholipides : le poids des larves 40 jours après l'éclosion atteignait 32 mg dans le groupe nourri avec le régime contenant 12% de phospholipides, la survie 72% et seulement 2% des larves présentaient des malformations squelettiques. Les larves nourries avec le régime ne contenant que 3% de phospholipides atteignaient un poids de 2 mg, la survie n'était que de 12% et 35% des larves présentaient des malformations de la mâchoire ou de la colonne vertébrale (Figs 6, 7).

L'effet bénéfique des phospholipides alimentaires sur le développement des larves de poissons et de crustacés avait déjà été signalé par Coutteau *et al.* (1997) et Gueurden *et al.*, (1997). Il pourrait s'expliquer par l'action conjuguée des deux principales classes : la phosphatidylcholine aurait un effet promoteur sur la croissance, le phosphatidylinositol limiterait l'apparition de difformités, comme cela a été suggéré chez la carpe *Cyprinus carpio* (Gueurden *et al.*, 1998).

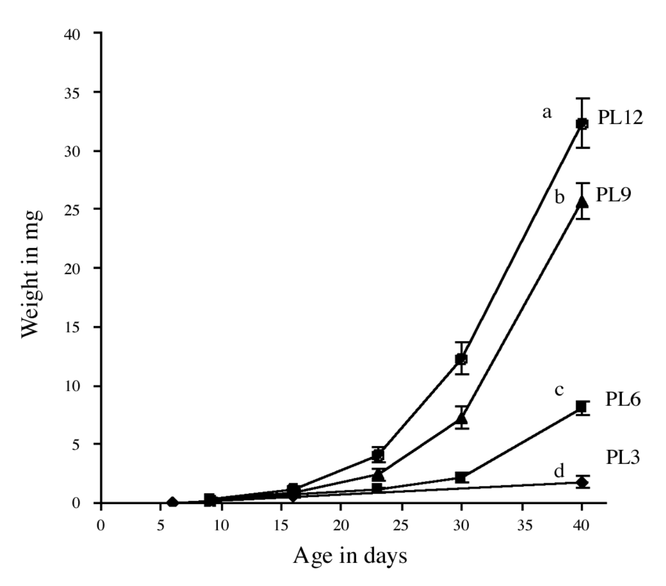


Figure 6. - Croissance des larves de bar nourries dès l'ouverture de la bouche avec des régimes contenant un gradient de phospholipides. *[Growth of sea bass larvae fed from mouth opening with diets including a phospholipid gradient.]*

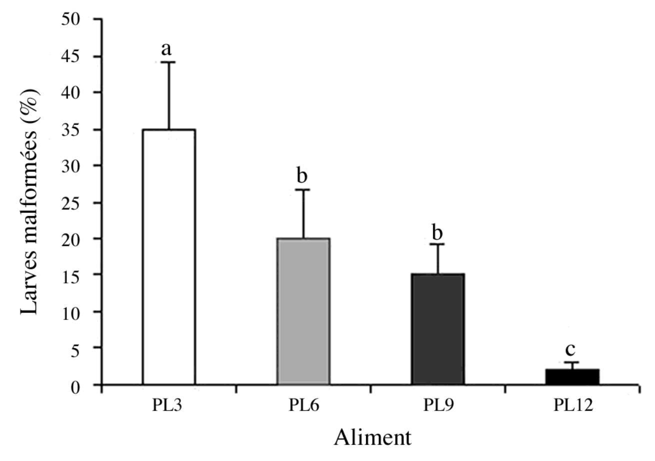


Figure 7. - Pourcentage des individus présentant des malformations osseuses parmi les larves nourries avec les régimes contenant un gradient de phospholipides. *[Percentage of larvae exhibiting bone malformations in larvae fed diets including a phospholipid gradient.]*

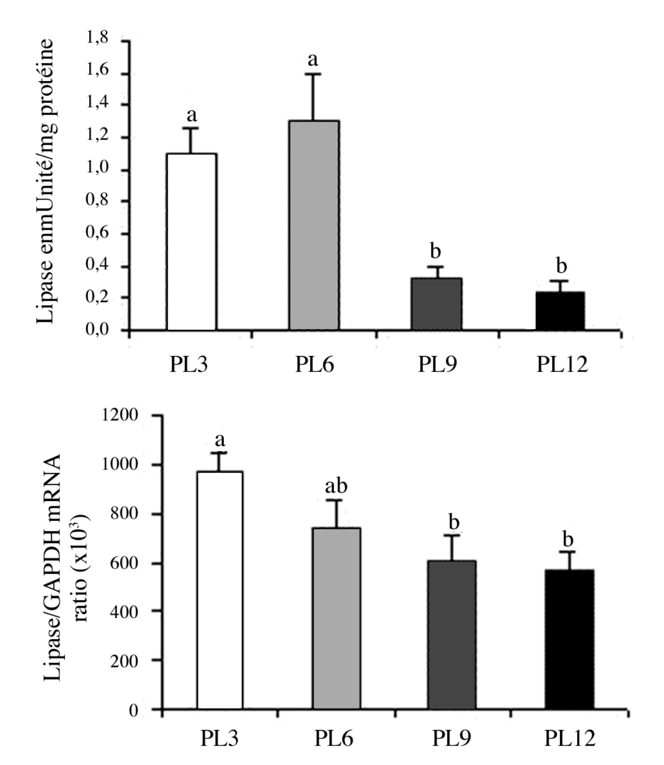


Figure 8. - Activité spécifique de la lipase et ratio des ARNm codant pour la lipase rapportée aux ARNm codant pour la GAPDH chez les larves de bar âgées de 40 jours et nourries avec différents taux de phospholipides. *[Lipase specific activity and ratio of lipase mRNA to GAPDH mRNA in 40 days old sea bass larvae fed on different phospholipid levels.]*

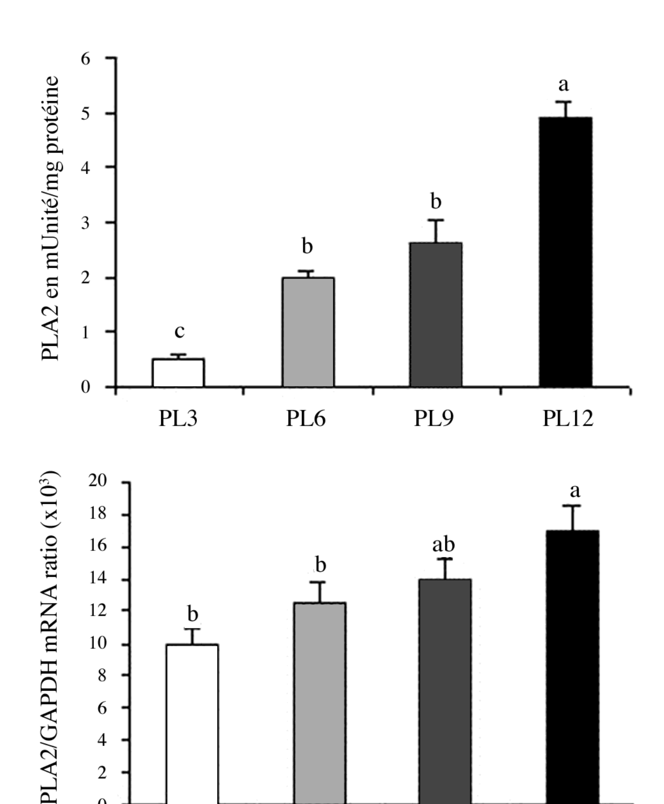


Figure 9. - Activité spécifique de la phospholipase et ratio des ARNm codant pour la phospholipase rapportée aux ARNm codant pour la GAPDH chez les larves de bar âgées de 40 jours et nourries avec différents taux de phospholipides. *[Phospholipase specific activity and ratio of lipase mRNA to GAPDH mRNA in 40 days old sea bass larvae fed on different phospholipid levels.]*

Les mesures des activités des deux enzymes lipolitiques, lipase et phospholipase, explique également le rôle essentiel des phospholipides au cours du développement, contrairement aux lipides neutres.

La réponse de la lipase au taux de lipides neutres alimentaires n'est pas linéaire. On peut discerner une activité de lipase faible en réponse à des taux de lipides alimentaires de 14 et 17%, et une activité forte pour des taux de lipides alimentaires de 20 et 23%. En revanche, la synthèse d'ARNm codant pour la lipase semble assez finement régulée par la concentration du substrat, les triglycérides (Fig. 8). Il semblerait donc qu'il existe une régulation post-transcriptionelle pour l'expression de la lipase. Elle pourrait être due à l'action d'une hormone gastro-intestinale, la secrétine, régulant les sécrétions pancréatiques. Plus que par la concentration en triglycérides, il semblerait que l'activité de la lipase soit affectée par leur nature. En effet, une expérience a montré que la quantité d'ARNm codant pour la lipase, aussi bien que son activité enzymatique, différait quand les larves de bar étaient nourries avec des régimes contenant soit de l'huile de poisson, de l'huile de coco ou de la trioléine (Morais *et al.*, 2004), ces huiles étant constituées de triglycérides contenant des acides gras de longueur de chaînes différentes.

L'expression de la phospholipase A2 (PLA2) est au contraire très finement régulée par son substrat, les phospholipides (Cahu *et al.*, 2003). La régulation de la PLA2 se fait essentiellement au niveau transcriptionnel, les activités de l'enzyme reflétant les quantités d'ARNm mesurées (Fig. 9). Cependant, une régulation supplémentaire semble influencer les activités enzymatiques. L'activité de l'enzyme est multipliée par 9 alors que la quantité d'ARNm n'augmente que de 1,6 fois entre les larves nourries avec le régime PL3 et le régime PL12. Cela suggère une régulation post-transcriptionnelle par une hormone, la cholecystokinine (Cahu *et al.*, 2004).

Ces résultats confirment donc que les enzymes digestives chez les larves en développement sont différemment régulées : la régulation apparaît plus ou moins tôt au cours du développement. De plus, la mauvaise utilisation d'un substrat, les lipides neutres en l'occurrence, semble liée à une régulation médiocre de la synthèse de l'enzyme correspondante. Des concentrations élevées de lipides dans l'aliment induisent d'importantes accumulations intracellulaires de gouttelettes de lipides dans les entérocytes de l'intestin anté-

rieur (Caballero *et al.*, 2003), pouvant révéler un mauvais transport des lipides neutres.

Il apparaît donc que le substrat lipidique préférentiellement utilisable par les larves est sous forme phospholipide (Gisbert *et al.*, 2005). Les lipides n'interviennent donc pas uniquement comme apport énergétique, car dans ce cas les lipides neutres seraient efficaces. Les rôles des phospholipides sont multiples : ils facilitent l'émulsion des lipides et leur digestion, ils interviennent dans le transport sanguin des lipides sous forme de lipoprotéines et ils sont une source d'acides gras longs polyinsaturés. Les poissons juvéniles ont la capacité de synthétiser les phospholipides à partir des précurseurs, mais cette capacité de synthèse est trop faible chez les larves pour couvrir les besoins liés à une morphogenèse, une organogenèse et une croissance très importante. En effet, une larve de bar multiplie son poids par un facteur 20 en un mois.

CONCLUSIONS

Notre travail avait pour but de comprendre les mécanismes de mise en place et de régulation des fonctions digestives des jeunes larves afin d'en déduire leurs besoins nutritionnels spécifiques. Nos études ont été menées sur un modèle, le bar, puis étendues à d'autres poissons marins. Il est apparu que les larves de poissons marins présentent, rapportée à leur poids, une capacité enzymatique considérable. Autour de 25 jours postéclosion chez le bar, un phénomène de maturation des fonctions digestives se produit comme chez les vertébrés supérieurs. Une partie du profil des activités enzymatiques au cours du développement est déterminée génétiquement mais certaines enzymes, comme la phospholipase, sont régulées très finement par l'aliment dès les plus jeunes stades. Ces résultats sur le développement et la régulation des enzymes ont permis de définir les besoins nutritionnels des larves et de proposer une formulation d'aliment parfaitement adaptée à ces jeunes stades (brevet international WO0064273, 1999).

RÉFÉRENCES

BECCARIA C., DIAZ J.P., CONNES R. & B. CHATAIN, 1991. - Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. *Aquaculture*, 99: 339-354.

BRINKMEYER R.L. & G.J. HOLT, 1995. - Response of red drum larvae to graded levels of menhaden oil in semipurified microparticulate diets. *Prog. Fish-Cult.*, 57: 30-36.

CABALLERO M.J., IZQUIERDO M.S., KJØRSVIK E., MONTERO D., SOCORRO J., FERNANDEZ A. & G. ROSENLUND, 2003. - Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225: 325-340.

CAHU C. & J.L. ZAMBONINO INFANTE, 1994. - Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: Effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109: 213-222.

CAHU C. & J.L. ZAMBONINO INFANTE, 1995a. - Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 431-437.

CAHU C. & J.L. ZAMBONINO INFANTE, 1995b. - Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 209-214.

CAHU C. & J.L. ZAMBONINO INFANTE, 1997. - Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for a compound diet feeding? *Aquacult. Int.*, 5: 151-160.

CAHU C., ZAMBONINO INFANTE J.L., ESCAFFRE A.M., BERGOT P. & S.J. KAUSHIK, 1998. - Preliminary results on larval rearing of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) without live food. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 169: 1-7.

CAHU C., ZAMBONINO INFANTE J.L., QUAZUGUEL P. & M.M. LE GALL, 1999. - Protein hydrolysate *vs* fish meal in compound diets for 10-days old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171: 109-119.

CAHU C., ZAMBONINO INFANTE J.L. & V. BARBOSA, 2003. - Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br. J. Nutr.*, 90(1): 21-28.

CAHU C., RØNNESTAD I., GRANGIER V. & J.L. ZAMBONINO INFANTE, 2004. - Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture*, 238: 295-308.

CARVALHO A.P.C., ESCAFFRE A.M., OLIVA TELES A. & P. BERGOT, 1997. - First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquacult. Int.*, 5: 361-367.

COUTTEAU P., GUEURDEN I., CAMARA MR., BERGOT P. & P. SORGELOOS, 1997. - Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 155: 149-164.

DABROWSKI K., 1984. - The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24: 807-833.

FERNANDEZ-DIAZ C. & M. YUFERA, 1997. - Detecting growth in gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae fed microcapsules. *Aquaculture*, 153: 93-102.

GEURDEN I., CHARLON N., MARION D. & P. BERGOT, 1997. - Influence of purified soybean phospholipids on early development of common carp. *Aquacult. Int.*, 5: 137-149.

GEURDEN I., MARION D., CHARLON N., COUTTEAU P. & P. BERGOT, 1998. - Comparison of different soybean phospholipidic fractions as dietary supplements for common carp, *Cyprinus carpio*, larvae. *Aquaculture* ,161: 225-235.

GISBERT E., VILLENEUVE L., ZAMBONINO INFANTE J.L., QUAZUGUEL P. & C. CAHU, 2005. - Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for highly unsaturated fatty acid supply in European sea bass larval development. *Lipids*, 40: 609-618.

HENNINGS S.J., 1987. - Functional development of the gastrointestinal tract. *In*: Physiology of the Gastrointestinal Tract (Johnson L.R., ed.), pp. 285-300. New York: 2nd edit., Raven Press.

KOLKOVSKI S., TANDLER A., KISSIL W. & A. GERTLER, 1993. - The effect of dietary exogenous enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish Physiol. Biochem*. ,12: 203-209.

LAZO J.P., DINIS M.T., HOLT G.J., FAULK C. & C.R. ARNOLD, 2000. - Co-finding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 188: 339-351.

MA H., CAHU C., ZAMBONINO J.L., YU H., DUAN Q., LE GALL M.M. & K. MAI, 2005. - Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, 245: 239-248.

MAI K., YU H., MA H., DUAN Q., GISBERT E., ZAMBONINO INFANTE J.L. & C. CAHU, 2005. - A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *J. Fish Biol*., 67: 1094-1106.

MORAIS S., CAHU C., ZAMBONINO INFANTE J.L., ROBIN J., RØNNESTAD I., DINIS M.T. & L.E.C. CONCEIAO, 2004. - Dietary TAG source and level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids*, 39: 449-458.

PERES A., CAHU C., ZAMBONINO INFANTE J.L., LE GALL M.M. & P. QUAZUGUEL, 1996. - Amylase and trypsin response to dietary carbohydrate and protein level depends on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem*., 15: 237-242.

PERES A., ZAMBONINO INFANTE J.L & C. CAHU, 1998. - Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem*., 19: 145-152.

RIBEIRO L., ZAMBONINO INFANTE J.L., CAHU C. & M.T. DINIS, 1999. - Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup. *Aquaculture*, 179: 465-473.

RØNNESTAD I., THORSEN A. & R.N. FINN, 1999. - Fish larval nutrition: A review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, 177: 201-216.

SALHI M., IZQUIERDO M.S., HERNANDEZ-CRUZ C.M., GONZALES M. & H. FERNANDEZ-PALACIOS, 1994. - Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 124: 275-282.

SALHI M., HERNANDEZ-CRUZ C.M., BESSONART M., IZQUIERDO M.S. & H. FERNANDEZ-PALACIOS, 1999. - Effect of different dietary polar lipid level and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 124: 275-282.

SARGENT J., Mc EVOY L., ESTEVEZ A., BELL G., BELL M., HENDERSON J. & D. TOCHER, 1999. - Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions. *Aquaculture*, 179: 217-229.

TAKEUCHI T., OHKUMA N., ISHIDA S., ISHIZUKA W., TOMITA M., HAYASAWA H. & H. MIYAKAWA, 1998. - Development of micro-particle diet for marine fish larvae. Abstract only. 8th International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish, June 1998, Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain: p. 193.

ZAMBONINO INFANTE J.L. & C. CAHU, 1994a. - Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem*., 12: 299-408.

ZAMBONINO INFANTE J.L. & C. CAHU, 1994b. - Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol*., 109: 209-212.

ZAMBONINO INFANTE J.L., CAHU C., PERES A., LE GALL MM. & P. QUAZUGUEL, 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* rations: Growth, pancreatic enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture*, 139: 129-138. .

ZAMBONINO INFANTE J.L. & C. CAHU, 1999. - High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr*., 129: 1195-1200.

ZAMBONINO INFANTE J.L., CAHU C. & A. PERES, 1997. - Partial substitution of native protein by di- and tripeptides in diet improves sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *J. Nutr*., 127: 608-614.